

DOI: 10.7251/VETJ1701093S

UDK: 616.988:579.842

Nataša Stević, Milovan Milovanović, Sonja Radojičić, Miroslav Valčić¹*Pregledni rad*

MOGUĆNOST DIJAGNOSTIKE BRUCELOZE DOMAĆIH ŽIVOTINJA

Kratak sadržaj

Kada se bruceloza ustanovi u jednoj zemlji, međunarodni veterinarski propisi nameću ograničenja kretanja životinja i trgovine, što dovodi do velikih ekonomskih gubitaka. Izolacija *Brucella spp.* konvencionalnim bakteriološkim tehnikama je dugotrajna, rizična za laboratorijske radnike i niske osetljivosti zbog česte kontaminacije materijala. Negativna izolacija ne isključuje postojanje bruceloze. Najbolji rezultati do sada su dobijeni kombinovanjem metoda izolacije i PCR metode na kliničkim uzorcima. Nedostatak PCR metoda baziranih na razlici među sojevima unutar vrste stimulusao je razvoj novih tehnika „otisaka prstiju”. Podaci o sekvenci celog genoma brucela omogućili su identifikaciju i razlikovanje brucela na nivou vrste, biovara i upoređivanje sojeva što je olakšalo pronalaženje izvora infekcije. Indirektni dijagnostički testovi su zasnovani na detekciji imunskog odgovora izazvanog infekcijom. Ovi testovi pokazuju različit stepen osetljivosti i specifičnosti zavisno od brojnih varijabli, poput stepena i načina inficiranja, prisustva takozvanih „unakrsno reaktivnih bakterija” antigenski sličnih *Brucella spp.* kinetike indukovano imunskog odgovora i prethodne vakcinacije. Imajući u vidu kinetiku nastajanja imunskog odgovora indukovano nakon infekcije, vreme kada će se različiti testovi izvoditi ima veliki uticaj na rezultate.

Ključne reči: bruceloza, izolacija, molekularne metode, serologija

¹ Nataša Stević, Milovan Milovanović, Sonja Radojičić, Miroslav Valčić: Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
Korespondentni autor: Natasa Stevic: e-mail: natasas@vet.bg.ac.rs
Rad je podržan sredstvima projekata Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj R. Srbije: TR31088 i TR37015

DOI: 10.7251/VETJ1701093S

UDK: 616.988:579.842

Nataša Stević, Milovan Milovanović, Sonja Radojičić, Miroslav Valčić*

Review paper

THE POSSIBILITY OF DIAGNOSIS OF DOMESTIC ANIMAL BRUCELLOSIS

Abstract

When brucellosis is detected in a country, international veterinary regulations impose restrictions on animal movements and trade, which result in huge economic losses. The isolation of *Brucella* spp. through conventional bacteriological techniques takes a long time, it's risky for the laboratory workers, and has low sensitivity due to the frequent contamination of materials. Negative cultures do not rule out the disease. The best results have so far been obtained by combining culture and PCR detection on clinical samples. The lack of PCR-based methods for differentiation among strains within a species stimulate the development of new techniques—"fingerprinting methods". Data on the sequence of the genome of *Brucella* enabled the identification and differentiation of *Brucella* at the level of species and biovar and comparison strains which is easier to find the source of infection. Indirect diagnostic tests are based on the detection of immune responses induced by infection. These tests show different sensitivities and specificities depending on numerous variables, such as the infection dose and route, the presence of so-called "cross-reactive bacteria" antigenically similar to *Brucella* spp., the kinetics of the induced immune response, and previous vaccination. Bearing in mind kinetics of the immune response induced after infection, the time when the different tests carried out has a major impact on the results.

Key words: *Brucellosis, isolation, molecular methods, serology*

Bruceloza je veoma stara bolest, čiji se tragovi mogu naći još u starom Egiptu, oko 1600 godina p.n.e. Jedna je od najčešćih zoonoza u svetu, sa oko 500 000 novih slučajeva oboljevanja ljudi svake go-

dine. Bruceloza na farmama dovodi i do velikih ekonomskih gubitaka usled pobačaja, rađanja slabo vitalnih mladunaca ili steriliteta. Izlučivanje brucela javlja se samo u određeno vreme, uglavnom

* Nataša Stević, Milovan Milovanović, Sonja Radojičić, Miroslav Valčić: Faculty of Veterinary Medicine University of Belgrade, Department of Infectious Animals Diseases and Diseases of Bees
Corresponding author: natasas@vet.bg.ac.rs

prilikom pobačaja, nakon koga se brucele izlučuju vaginalnim iscetkom u dugom vremenskom periodu (Carmichael i sar., 1990). Brucele se smatraju jednim od najčešćih izazivača laboratorijskih infekcija (Mohamed i sar., 2009).

Brucele su gram-negativne, fakultativno intracelularne bakterije koje mogu da inficiraju mnoge vrste životinja i čoveka. Do sada je otkriveno dvanaest vrsta u okviru roda *Brucella*: *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella canis*, *Brucella neotomae*, *Brucella pinnipedialis*, *Brucella ceti*, *Brucella microti*, *Brucella inopinata*, *Brucella papionis* (Whatmore i sar., 2014) i *Brucella vulpis* (Scholz i sar., 2016). Klasifikacija se uglavnom zasniva na razlikama u patogenosti i primarnom domaćinu (Moreno i sar., 2002). Razlika između vrsta i između biotipova jedne vrste se vrši pomoću diferencijalnih testova zasnovanih na fenotipskim karakteristikama lipopolisaharidnih antigena (LPS), osetljivosti na boje i bakteriofage, potrebi za CO₂, stvaranju H₂S i metaboličkim osobinama (Alton i sar., 1988).

Otkrivanje prisustva bruceloze domaćih životinja u što kraćem roku je veoma važno zbog kontrole prisustva bolesti kod životinja, a indirektno i kod ljudi. Period inkubacije kod nekih jedinki može biti veoma dug, dok druge mogu ostati serološki negativne u dužem vremenskom periodu nakon infekcije. Otkrivanje prisustva bolesti kod jedne životinje dovoljan je dokaz da je bolest prisutna i kod drugih životinja koje se nalaze u kohabitaciji. Učešće veterinarskih službi, aktivna podrška

državnih institucija, edukacija vlasnika životinja, kao i brza i tačna dijagnostika uslov su za pravovremenu eradikaciju bolesti.

Dijagnostički testovi se mogu podeliti na one kojima se direktno dokazuje prisustvo uzročnika, kao što su bakteriološke metode i PCR, i na one testove koji detektuju imunski odgovor životinje na uzročnika oboljenja, odnosno otkrivaju prisustvo antitela protiv *Brucella spp.* Izolacija *Brucella spp.* ili detekcija DNK *Brucella spp.* PCR metodom su jedine metode koje omogućavaju sigurnu dijagnozu. Biotipizacija pruža vredne epizootiološke informacije koje omogućavaju praćenje porekla i kretanja infekcije do njenih izvora u zemljama u kojima postoji i kruži nekoliko biovara. Međutim, kada jedan biovar ubedljivo preovlađuje, klasične dijagnostičke metode nisu od koristi jer ne dozvoljavaju diferencijaciju izolata koji pripadaju istom biovaru iste vrste. U tom kontekstu, novim metodama „otiska prstiju” kao što su analiza broja uzastopnih ponavljanja na više lokusa (MLVA – multiple locus variable number of tandem repeat analysis), koja meri broj tandem ponavljanja u datom lokusu i analiza više genskih lokusa (MLSA – multilocus sequence analysis) mogu se razlikovati izolati u okviru biovara. Ove metode dobijaju sve širi značaj i ulaze u rutinsku dijagnostiku u epizootiološke svrhe (Le Fleche i sar., 2006, Maquart i sar., 2009, Whatmore i sar., 2009).

Za postavljanje dijagnoze bruceloze, izbor uzoraka zavisi od kliničkih znakova. U slučaju kliničke bruceloze, validni uzor-

ci obuhvataju pobačene fetuse ili njihove organe (želudac, slezina i pluća), posteljice, vaginalni iscedak, kolostrum, mleko, spermu i tečnosti uzorkovane iz zglobova u slučaju artritisa ili sadržaj higroma. Kada god ih je moguće uzorkovati, tkiva izbora su reproduktivni organi, limfni čvorovi, slezina i mlečna žlezda sa pripadajućim limfnim čvorovima. Za izolaciju *Brucella spp.* najčešće su u upotrebi Farrell medijum, bifazni Castaneda medijum, Thayer Martin. Ove podloge sadrže antibiotike sposobne da inhibiraju rast ostalih bakterija prisutnih u kliničkim uzorcima. Nekim *Brucella spp.* kao što je *B. abortus* potreban je CO₂ za rast, dok drugima nije (Alton i sar., 1988). Porast bakterija se može pojaviti posle 2–3 dana, ali kulture se obično smatraju negativnim posle 2–3 nedelje inkubacije (Alton i sar., 1988). Identifikacija *Brucella spp.* zasniva se na morfologiji, bojenju i metaboličkom profilu (katalaza, oksidaza i ureaza testovi) (Alton i sar., 1988). Bojenje po Stampu se često koristi i daje korisne informacije, iako ova tehnika nije specifična jer se i neke druge bakterije takođe oboje crveno. *Brucella spp.* je kokobacil, dužine 0.6–1.5 µm, i širine 0.5–0.7 µm. Obično se javljaju pojedinačno ili u grupama od dve ili više bakterija. *Brucella spp.* su gram-negativne bakterije. Izolacija *Brucella spp.* konvencionalnim bakteriološkim tehnikama je dugotrajna, rizična za laboratorijske radnike i niske osetljivosti zbog česte kontaminacije materijala. Kada je materijal kontaminiran u značajnoj meri, izolacija je neuspešna i pored primene selektivnih podloga (Carmichael i sar., 1990). Neuspehu izolacije doprinosi re-

lativno spor rast brucela u poređenju sa kontaminentima i činjenici da se brucele u ispitujućem materijalu mogu nalaziti u malom broju. Izolacija bakterija je teška jer postoji mogućnost da bakterije nisu prisutne u određenom uzorku, pogotovo ako su životinje prethodno primile antibiotiku terapiju. Takođe, prilikom izolacije veoma je važno i praktično iskustvo laboratorijskog radnika. Bakteriološka izolacija je spora, skupa i komplikovana, ali se preporučuje kada god je to moguće da bi se sa sigurnošću potvrdila dijagnoza. Negativna izolacija ne isključuje postojanje bolesti.

Biotipizacija *Brucella spp.* se vrši pomoću različitih testova, od kojih su najvažniji testovi aglutinacije sa antitelima protiv hrapavih-R ili glatkih-S LPS, osetljivost na bakteriofage, potreba za CO₂ za rast, stvaranje H₂S, rast u prisustvu baznog fuksina ili tionina i aglutinacija sa akriflavinom (Alton i sar., 1988).

Nekoliko PCR metoda je razvijeno za dijagnostiku bruceloze. Najbolje validirane metode su zasnovane na otkrivanju specifičnih sekvenci *Brucella spp.*, kao što su 16S-23S geni, IS711 insercijska sekvenca ili bcs31 gen koji kodira 31-kDa protein (Baddour i sar., 2008, Ouahrani-Bettache i sar., 1996). Za tipizaciju *Brucella spp.*, često se koristi multipleks AMOS PCR (abortus, melintensis, ovis, suis). Ovaj PCR i PCR protokoli izvedeni iz njega omogućavaju razlikovanje između *Brucella* vrsta i između vakcinalnih i divljih sojeva. Oni, međutim, ne omogućavaju razlikovanje svih biotipova datih *Brucella* vrsta (Bricker i sar., 1994, Bric-

ker 2002, Bricker i sar., 2003). Multipleks "Bruce ladder" PCR je prvi metod dizajniran da identifikuje i razlikuje sve poznate vrste *Brucella* i vakcinalne sojeve u istom testu (Garcia-Yoldi i sar., 2006). Ove tehnike su prvobitno razvijene na bakterijskim izolatima i sada se koriste za otkrivanje DNK *Brucella spp.* u kliničkim uzorcima. Zna se da metode ekstrakcije DNK utiču na osetljivost PCR testova i potrebno ih je proceniti (Dauphin i sar., 2009). PCR metode u dijagnostici bruceloze imaju nižu osetljivost od metoda izolacije bakterija, iako je njihova specifičnost blizu 100% (Bricker, 2002, Leyla i sar., 2003, Marianelli i sar., 2008). Razlog neuspeha PCR metoda u detekciji DNK brucela u kliničkim uzorcima može biti vrlo mala, nedetektabilna količina DNK u uzorcima tkiva. Osim toga, uzorci tkiva u sebi sadrže inhibitorne komponente koje ometaju PCR reakciju. Takođe, postoji i problem raspoređenosti *Brucella* tj. DNK u tkivima koja su uzorkovana. Sve nabrojano može biti razlog dobijanja lažno negativnih rezultata u PCR. Najbolji rezultati do sada su dobijeni kombinovanjem izolacije i PCR metode na kliničkim uzorcima (Leyla i sar., 2003, Marianelli i sar., 2008, Hinić i sar., 2009).

Nedostatak PCR metoda baziranih na razlici među sojevima unutar vrste stimulišao je razvoj drugih tehnika molekularne tipizacije *Brucella spp.* Nekoliko novih tehnika „otisaka prstiju“ pokazuju perspektive za razlikovanje izolata unutar istog biovara date vrste: polimorfizam jednog nukleotida koji detektuje razlike u jednom nukleotidu u DNK sekvenci pripadnika jedne vrste, MLSA koji detektuje

varijacije DNK sekvence u nizu housekeeping gena i karakteriše sojeve njihovim jedinstvenim alelnim profilima i MLVA koja analizira varijabilnost lokusa koji sadrži ponovljene sekvence (Le Fleche i sar., 2006, Maquart i sar., 2009, Whatmore i sar., 2009). Podaci o sekvenci celog genoma brucela omogućili su identifikaciju i razlikovanje brucela na nivou vrste, biovara i upoređivanje sojeva što je olakšalo pronalaženje izvora infekcije. Analiza broja uzastopnih ponavljanja na više lokusa (multiple locus variable number of tandem repeat analysis – MLVA) je metoda koja se ističe kao jednostavna, stabilna, ponovljiva i epizootiološki korisna. Dostupna je velikom broju istraživača i dobijeni rezultati se lako mogu upoređivati na međunarodnom nivou i na taj način se dobijaju važni epizootiološki podaci. Međunarodna baza podataka (<http://mlva.u-psud.fr>) je osnovana 2006. godine na Univerzitetu Paris Sud u Orsayu i zasniva se na postupku identifikacije „otisaka prstiju“. U bazi se nalaze podaci o izolatima iz različitih delova sveta. Za izvođenje MLVA se koristi neinfektivni materijal. Ova metoda se upotrebljava za dokazivanje izvora zaraze, za razlikovanje pojave nove infekcije od već postojećih, razlikovanje vakcinalnih od terenskih sojeva.

Indirektni dijagnostički testovi su zasnovani na detekciji imunskog odgovora izazvanog infekcijom. Ovi testovi pokazuju različit stepen osetljivosti i specifičnosti zavisno od brojnih varijabli, poput stepena i načina inficiranja, prisustva takozvanih „unakrsno reaktivnih bakterija“ antigeni sličnih *Brucella spp.*, ki-

netike indukovano imunoskog odgovora i prethodne vakcinacije (Saegerman i sar., 2004, Sutherland, 1984). Serologija je metoda izbora za skrining ili programe iskorenjivanja. Nakon izlaganja brucelama u organizmu životinje indukovano je jak humoralni imunski odgovor. IgG nastaju 3–4 nedelje nakon infekcije i mogu se detektovati tokom dugog vremenskog perioda (do nekoliko godina). Nasuprot tome, IgM se ubrzano indukuju, 2–3 nedelje nakon ekspozicije, i mogu nestati nakon nekoliko meseci (Saegerman i sar., 2004, Sutherland, 1984, Godfroid i sar., 2002). Čelijski posredovan imunski odgovor (indukovan 3–4 nedelje nakon izlaganja), detektovan testom preosetljivosti kože je dugotrajan i može se detektovati i nakon nekoliko godina (Saegerman i sar., 1999). Imajući u vidu kinetiku nastajanja imunoskog odgovora indukovano nakon infekcije, vreme kada će se različiti testovi izvoditi ima veliki uticaj na rezultate. Kinetika proizvodnje i nestanka glavnih izotipova imunoglobulina tokom infekcije i aktivnost ovih imunoglobulina u različitim serološkim testovima, obično omogućava razliku između akutnih i hroničnih infekcija. Istovremeno prisustvo IgM i IgG sugeriše na akutnu brucelozu, a hroničnu brucelozu karakteriše samo prisustvo IgG.

Serološka dijagnostika bruceloze obično se izvodi korišćenjem istog antigena jer su imunodominantni antigeni brucela povezani sa glatkim LPS koji deli većina vrsta brucela: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis* i *B. microti*. Većina seroloških testova za dijagnostiku bruceloze još uvek nije stan-

dardizovana. *B. canis* i *B. ovis* imaju hrpav R, a ne gladak antigen čelijskog zida (Carmichael i sar., 1968). Antigen *B. ovis* se koristi i kao antigen u dijagnostici bruceloze pasa zbog njegove sličnosti sa *B. canis* i jednostavne proizvodnje (Brown i sar., 1976, George i sar., 1974). Testovi koji su u upotrebi su brzi test aglutinacije na pločici (rapid slide agglutination test – RSAT i ME-RSAT), spori test aglutinacije u epruveti (tube agglutination test – TAT), test indirektno imunofluorescence (IFA), agar gel imunodifuzioni test sa antigenima čelijskog zida (AGIDcwa), agar gel imunodifuzioni test sa citoplazmatskim antigenima (AGIDcpa), ELISA. Prisustvo antibruceloznih antitela pokazuje izloženost životinje *Brucella spp.*, ali ne ukazuje koja vrsta brucela je indukovala proizvodnju tih antitela. Serokonverzija ne znači da životinje imaju tekuću ili aktivnu infekciju u vreme uzorkovanja. Istraživanja pokazuju da skoro sve životinjske vrste osetljive na infekciju mogu izgubiti titar antitela. Titar antitela može varirati čak i tokom bakterijemije. Visina titra ne odražava fazu bolesti. To znači da stvarna prevalencija bruceloze može biti veća od one koja se utvrdi detekcijom antitela.

Prilikom izvođenja seroloških testova aglutinacije ispituje se prisustvo antigena čelijskog zida ili citoplazmatskih proteinskih antigena. Rezultati mogu biti negativni tokom prve 3–4 nedelje infekcije (Greene i Carmichael, 2006) i infekcija se može detektovati nakon ovog perioda. Ispitujući serum se meša sa suspenzijom obojenih (Rose-Bengal) i toplotom inaktivisanih *Brucella spp.* na pločici. Ako

se pojavi aglutinat test se smatra pozitivnim i dalje se sprovode precizniji testovi. RSAT se smatra veoma osetljivim (detektuje istinski inficirane životinje), ali ne i specifičnim (razlika između stvarno pozitivnih i stvarno negativnih). Retko se javljaju lažno negativne reakcije (*Flores-Castro* i sar., 1977, *Wooley* i sar., 1978), ali u čak 50–60% dolazi do lažno pozitivnih rezultata (*Brown* i sar., 1976, *Flores-Castro* i sar., 1977). Nedostatak RSAT je pojava unakrsnih reakcija sa *Bordetella*, *Pseudomonas*, *Moraxella* i drugim gram negativnim bakterijama (*Carmichael*, 1979, *Carmichael*, 1976). U dijagnostici bruceloze goveda i malih preživara Rose Bengal test ponekada može dati lažno pozitivne rezultate kod vakcinisanih životinja. I pored toga ovaj test je dobar skrining test za otkrivanje inficiranih stada ili kao test kojim će se isključiti prisustvo infekcije u zapatima slobodnim od bruceloze (OIE, 2016).

Modifikovana metoda RSAT (ME - RSAT) podrazumeva dodatak 2-merkaptoetanola (2-ME) u cilju inaktivacije nespecifičnih IgM i povećanja specifičnosti testa. ME-RSAT je skrining test i koristan je kao sledeći korak u testiranju seruma koji su se pokazali kao RSAT pozitivni (*Badaksh* i sar., 1982). Životinje mogu biti pozitivne 30 meseci nakon što je bakterijemija prošla, mada se lažno negativne reakcije mogu javiti tokom prvih 8 nedelja od početka infekcije.

Testom spore aglutinacije u epruveti (TAT) detektuju se antitela protiv *B. canis* kod pasa koji su bili pozitivni na RSAT ili ME-RSAT. Test je pozitivan kod životi-

nja 2–4 nedelje nakon infekcije. Različita razblaženja testiranog seruma se dodaju u razblaženi antigen *B. canis*. Titar 1:200 smatra se aktivnom infekcijom (*Fredrickson* i *Barton*, 1974, *Rhoades* i *Mesfin*, 1980, *Flores-Castro* i *Carmichael*, 1977, *Henderson* i sar., 1974). Postoji dobra korelacija između visine titra 1:200 i izolacije brucela iz krvi. Životinje kod kojih se utvrdi titar antitela ispod 1:200 treba ponovo testirati 2 nedelje kasnije. Test je osetljiv, ali ne i dovoljno specifičan (lažno pozitivni rezultati).

Prilikom izvođenja agar gel imunodifuzionog testa (AGID) u agaroznom gelu se iseče sedam bunarčića, šest perifernih i jedan centralni. U periferne bunarčiće se unose ispitujući, poznati pozitivni i negativni serumi, a u centralni antigen. Antitela difuzno putuju ka centru, a antigen ka njima i formiraju vidljivi oštar precipitinski luk (*Zoha* i *Carmichael*, 1982). U upotrebi su dva antigena, antigen poreklom od ćelijskog zida i citoplazmatski antigen. Test sa lipopolisaharidnim antigenom iz ćelijskog zida bakterije je manje specifičan od testa u kome se koristi unutrašnji citoplazmatski antigen. AGIDcwa je veoma osetljiv test, ali ipak se javljaju i lažno pozitivne reakcije. Pozitivan test se očekuje 8–12 nedelja od početka infekcije pa do 3 do 4 godine posle. Citoplazmatski antigen čine rastvorljivi proteini koji su ekstrahovani iz *B. canis* ili *B. abortus*. Ovaj najspecifičniji, a najmanje osetljiv antigen reaguje sa antitelima protiv *Brucella* vrsta. Test je negativan na početku infekcije. Slično kao i kod antigena ćelijskog zida, pozitivna reakcija javlja se 8–12 nedelja nakon infekcije i traje duže od 5 go-

dina. Agar gel imunodifuzioni test je često u upotrebi prilikom dijagnostikovanja infekcija izazvanih *B. ovis*. Xavier i sar. su upoređujući tri metode uočili nedostatke ovog testa koji se ogledaju u smanjenoj osetljivosti u slučaju hroničnih infekcija, kao i razlikama u kvalitetu komercijalno dostupnih antigena (Xavier i sar., 2011).

Postoje dve kategorije ELISA testova koje se koriste za dijagnostiku bruceloze, indirektna ELISA (iELISA) i kompetitivna ELISA (cELISA). Većina iELISA sadrži prečišćene glatke LPS kao antigen. Većina iELISA otkriva uglavnom IgG ili IgG podklase. Njihov glavni kvalitet je njihova visoka osetljivost, ali su osetljivi i na nespecifične reakcije kao kod infekcije *Yersinia enterocolitica* serotip O:9. Ove unakrsne reakcije u iELISA testovima dovele su do razvoja cELISA testa. O-lanac glatkih LPS *Brucella spp.* sadrži specifične epitope koje ne dele sa LPS-om *Yersinia enterocolitica* serotip O:9. Tako je korišćenjem monoklonskih antitela usmerenih protiv konkretnih epitopa na *Brucella* LPS, razvoj specifičnijih cELISA omogućen. Ovi testovi su specifični, ali manje osetljivi nego iELISA (Nielsen i sar., 1995, Weynants i sar., 1996).

Test fluorescentne polarizacije se zasniva na fizičkom principu: brzina okretanja molekula u tačnom medijumu u korelaciji je sa njegovom masom. Molekuli male veličine okreću se brže i depolarizuju polarizovan snop svetlosti više, dok se veći molekuli vrte sporije i, samim tim, depolarizuju svetlost manje. Test fluorescentne polarizacije meri stepen depolarizacije u milipolarizacionim jedinica-

ma (mP). Tokom testa, uzorci seruma se inkubiraju sa specifičnim antigenom *B. abortus* obeleženim fluorescein izotiocijanatom. U prisustvu antitela protiv *Brucella spp.*, formiraju se veliki fluorescentni kompleksi. U negativnim uzorcima, antigen ostaje slobodan. Ovi manji molekuli se brže okreću i izazivaju veću depolarizaciju svetlosti nego uzorci pozitivni na *Brucella spp.* Ovaj test može biti lako automatizovan i veoma je brz, jer nakon mešanja obeleženog antigena i seruma očitavanje je gotovo trenutno. Osetljivost testa izgleda nešto niže nego iELISA (McGiven i sar., 2003). Specifičnost varira između 98.8 i 99.0% (Greiner i sar., 2009).

Serološke metode su najčešće korišćene metode u dijagnostici bruceloze, ali usled značajnog broja lažno negativnih rezultata ističe se važnost direktnih metoda dijagnostike, poput izolacije bakterija i PCR-a, a u cilju poboljšanja dijagnostike bruceloze. U dijagnostici bruceloze serološki testovi su veoma zastupljeni uglavnom kao skrining testovi. Iako su dosta unapređeni po pitanju osetljivosti i specifičnosti i dalje imaju dosta nedostataka, a jedan od njih je nemogućnost razlikovanja vakcinisanih od obolelih jedinki. Trebalo bi uvek kao skrining uraditi neki od brzih, najjednostavnijih, a dovoljno osetljivih seroloških testova, a zatim pozitivne uzorke testirati specifičnijim testovima u cilju postavljanja konačne dijagnoze. OIE preporučuje Rose Bengal test, reakciju vezivanja komplementa, ELISA test i test fluorescentne polarizacije kao skrining testove u dijagnostici bruceloze goveda i malih preživara (OIE, 2016). Za dijagnostiku bruceloze ovaca izazvane *B.*

ovis najpouzdanije je koristiti AGID i iELISA test zajedno. Za potrebe međunarodnog transporta koristi se reakcija vezivanja komplementa jer druge metode nisu standardizovane (OIE, 2015). Zlatni standard u dijagnostici bruceloze ostaje izolacija *Brucella* spp. Molekularne metode se trenutno najviše koriste u epizootiološke svrhe, ali u skoroj budućnosti mogle bi postati rutinske tehnike u laboratorijama.

LITERATURA

1. Alton G. G., Jones L. M., Angus R. D., Verger J. M. (1988): Techniques for the brucellosis laboratory. 1st edition. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique.
2. Badaksh F. F., Carmichael L. E., Douglass J. A. (1982): Improved rapid slide agglutination test for presumptive diagnosis of canine brucellosis. J Clin Microbiol 15: 286–289.
3. Baddour M. M., Alkhalifa D. H. (2008): Evaluation of three polymerase chain reaction techniques for detection of *Brucella* DNA in peripheral human blood. Can J Microbiol. 54: 352–357.
4. Bricker B. J., Halling S. M. (1994): Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. J Clin Microbiol. 32: 2660–2666.
5. Bricker B. J. (2002): PCR as a diagnostic tool for brucellosis. Vet Microbiol. 90: 435–446.
6. Bricker B. J., Ewalt D. R., Olsen S. C., Jensen A. E. (2003): Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. J Vet Diagn Invest. 15: 374–378.
7. Brown J., Blue J. L., Wooley R. E., Dreesen D. W., Carmichael L. E. (1976): A serologic survey of a population of Georgia dogs for *Brucella canis* and an evaluation of the slide agglutination test. J Am Vet Med Assoc 169: 1214–1216.
8. Carmichael L. E., Bruner D. W. (1968): Characteristics of a newly recognized species of *brucella* responsible for infectious canine abortion. Cornell Vet 58: 579–592.
9. Carmichael L. E. (1976): Canine brucellosis: an annotated review with selected cautionary comments. Theriogenology 6: 105–116.
10. Carmichael L. E. (1979): Brucellosis (*Brucella canis*). In: Steele JH editor. Handbook series in zoonoses, Sect. A, v.1, Boca Raton FL, CRC Press Inc. p. 185–194.
11. Carmichael L. E. (1990): In: Nielsen, K. Duncan JR., Eds. Animal brucellosis. CRC: Boca Raton; pp. 335–350
12. Dauphin L. A., Hutchins R. J., Bost L. A., Bowen M. D. (2009): Evaluation of automated and manual commercial DNA extraction methods for recovery of *Brucella* DNA from suspensions and spiked swabs. J Clin Microbiol. 47: 3920–3926.
13. Flores-Castro R., Carmichael L. E. (1977): Canine brucellosis: current status of methods for diagnosis and treatment. In: 27th gainses veterinary symposium. p. 17–24.
14. Fredrickson L. E., Barton C. E. (1974): A serologic survey for canine brucellosis in a metropolitan area. J Am

- Vet Med Assoc 165(11): 987–989.
15. Garcia-Yoldi D., Marin C. M., de Miguel M. J., Munoz P. M., Vizmanos J. L., Lopez-Goni I. (2006): Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. Clin Chem. 52: 779–781.
 16. George L. W., Carmichael L. E. (1974): A plate agglutination test for the rapid diagnosis of canine brucellosis. Am J Vet Res 35: 905–909.
 17. Godfroid J., Saegerman C., Wellemans V., Walravens K., Letesson J. J., Tibor A., Mc Millan A., Spencer S., Sanna M., Bakker D., Pouillot R., Garin-Bastuji B. (2002): How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. Vet Microbiol. 90: 461–477.
 18. Greene C. E., Carmichael L. E. (2006). Canine brucellosis. In: Greene CE, editor. Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia: WB Saunders, Co. p. 369–381.
 19. Greiner M., Verloo D., de Massis F. (2009): Meta-analytical equivalence studies on diagnostic tests for bovine brucellosis allowing assessment of a test against a group of comparative tests. Prev Vet Med. 92: 373–381.
 20. Henderson R. A., Hoerlein B. F., Kramer T. T., Meyer M. E. (1974): Discospondylitis in three dogs infected with *Brucella canis*. J Am Vet Med Assoc 165: 451–455.
 21. Hinić V., Brodard I., Thomann A., Holub M., Miserez R., Abril C. (2009): IS711-based real-time PCR assay as a tool for detection of *Brucella* spp. in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology. BMC Vet Res. 5: 22.
 22. Le Fleche P., Jacques I., Grayon M., Al Dahouk S., Bouchon P., Denoeud F., Nöckler K., Neubauer H., Guilloteau L. A. and Vergnaud G. (2006): Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. BMC Microbiol. 6: 9.
 23. Leyla G., Kadri G., Umran O. (2003): Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. Vet Microbiol. 93: 53–61.
 24. Maquart M., Le Fleche P., Foster G., Tryland M., Ramisse F., Djønne B., Al Dahouk S., Jacques I., Neubauer H., Walravens K., Godfroid J., Cloeckaert A. and Vergnaud G. (2009): MLVA-16 typing of 295 marine mammal *Brucella* isolates from different animal and geographic origins identifies 7 major groups within *Brucella ceti* and *Brucella pinnipedialis*. BMC Microbiol. 9: 145.
 25. Marianelli C., Martucciello A., Tarantino M., Vecchio R., Iovane G., Galiero G. (2008): Evaluation of molecular methods for the detection of *Brucella* species in water buffalo milk. J Dairy Sci. 91: 3779–3786.
 26. McGiven J. A., Tucker J. D., Perrett L. L., Stack J. A., Brew S. D., MacMillan A. P. (2003): Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and

- comparison to SAT, CFT, and iELISA. J Immunol Methods. 278: 171-178.
27. Moreno E., Cloeckaert A., Moriyon I. (2002): *Brucella* evolution and taxonomy. Vet Microbiol. 90: 209-227.
28. Nielsen K. H., Kelly L., Gall D., Nicoletti P., Kelly W. (1995): Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. Vet Immunol Immunopathol. 46: 285-291.
29. OIE Terrestrial Manual 2015. Ovine epididymitis (*Brucella ovis*) http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.08_OVINE_EPID.pdf
30. OIE Terrestrial Manual 2016. Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) (infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.04_BRUCELLOSIS.pdf
31. Ouahrani-Bettache S., Soubrier M. P., Liautard J. P. (1996): IS6501-anchored PCR for the detection and identification of *Brucella* species and strains. J Appl Bacteriol. 81: 154-160.
32. Rhoades H. E., Mesfin G. M. (1980): *Brucella canis* infection in a kennel. Vet Med/Small Anim Clin 595-599.
33. Saegerman C., Vo T. K., De Waele L., Gilson D., Bastin A., Dubray G., Flanagan P., Limet J. N., Letesson J. J., Godfroid J. (1999): Diagnosis of bovine brucellosis by skin test: conditions for the test and evaluation of its performance. Vet Rec. 145:214-218.
34. Saegerman C., De Waele L., Gilson D., Godfroid J., Thiange P., Michel P., Limbourg B., Vo T. K., Limet J., Letesson J. J., Berkvens D. (2004): Evaluation of three serum i-ELISAs using monoclonal antibodies and protein G as peroxidase conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. Vet Microbiol. 100: 91-105.
35. Seleem M. N., Boyle S. M., Sriranganathan N. (2010): Brucellosis: A re-emerging zoonosis. Veterinary Microbiology 140: 392-398.
36. Scholz H. C., Revilla-Fernández S., Al Dahouk S., Hammerl J. A., Zygmunt M. S., Cloeckaert A., Koylass M., Whatmore A. M., Blom J., Vergnaud G., Witte A., Aistleitner K., Hofer E. (2016): *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). Int J Syst Evol Microbiol.; 66(5): 2090-8.
37. Sutherland S. S. (1984): Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of cattle infected with *Brucella abortus*. Vet Microbiol. 10: 23-32.
38. Weynants V., Gilson D., Cloeckaert A., Denoel P. A., Tibor A., Thiange P., Limet J. N., Letesson J. J. (1996): Characterization of a monoclonal antibody specific for *Brucella* smooth lipopolysaccharide and development of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay to improve the serological diagnosis of brucellosis. Clin Diagn Lab Immunol. 3: 309-314.
39. Whatmore A. M. (2009): Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. Infect Genet Evol. 9: 1168-1184.
40. Whatmore A. M., Davison N., Cloec-

- kaert A., Al Dahouk S., Zygmunt M. S., Brew S.D., Perrett L.L., Koylass M.S., Vergnaud G., Quance C., Scholz H.C., Dick E.J. Jr., Hubbard G., and Schlabritz-Loutsevitch N. E. (2014): "*Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.)." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:4120–4128.
41. Wooley R. E., Hitchcock P. L., Blue J. L., Neumann M. A., Brown J., Shotts E. B. (1978): Isolation of *Brucella canis* from a dog seronegative for brucellosis. J Am Vet Med Assoc 173: 387–388.
42. Xavier M. N., Sant'Anna F. M., Silva T. M. A., Costa E. A., Moustacas V. S., Merlo F. A., Carvalho Júnior C. A., Dasso M. G., Mathias L. A., Gouveia A. M. G., Lage A. P., Santos R. L. (2011): A comparison of two agar gel immunodiffusion methods and a complement fixation test for serologic diagnosis of *Brucella ovis* infection in experimentally infected rams. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.63, n.4, p.1016–1021.
43. Zoha S. J., Carmichael L. E. (1982): Serological responses of dogs to cell wall and internal antigens of *Brucella canis*. Vet Microbiol 7: 35–50.

Rad primljen: 14.05.2017.

Rad odobren: 14.09.2017.

